

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 11 月 21 日 (21.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/092121 A1(51) 国際特許分類: A61K 38/17, 38/00,
A61P 25/00, 25/16, 25/28, 25/14, 25/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04558

(22) 国際出願日: 2002 年 5 月 10 日 (10.05.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-141462 2001 年 5 月 11 日 (11.05.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財
団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUN-
DATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RE-
SEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県 熊
本市 大塚一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP). 久光製薬
株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO.,
INC.) [JP/JP]; 〒841-8686 佐賀県 鳥栖市 田代大官町
4 0 8 番地 Saga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平嶋 正樹 (HI-
RASHIMA, Masaki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡
旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及血
清療法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 成瀬 毅志
(NARUSE, Takeshi) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡
旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及血
清療法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 前田 浩明(MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池郡
旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及血
清療法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 野崎 周英
(NOZAKI, Chikateru) [JP/JP]; 〒869-1298 熊本県 菊池
郡 旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4-1 財団法人化学及
血清療法研究所菊池研究所内 Kumamoto (JP). 後藤 武
(GOTO, Takeshi) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市
観音台 1-2 5-1 1 久光製薬株式会社研究開発本部
基礎研究所内 Ibaraki (JP). 秋山 勝彦 (AKIYAMA, Kat-
suhiko) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台
1-2 5-1 1 久光製薬株式会社研究開発本部基礎
研究所内 Ibaraki (JP). 福島 秀尚 (FUKUSHIMA, Hi-
denao) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台
1-2 5-1 1 久光製薬株式会社研究開発本部基礎研
究所内 Ibaraki (JP).(74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒
540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
I MP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL REMEDIES FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE

(54) 発明の名称: 新規な神経変性疾患治療剤

(57) Abstract: Remedies for neurodegenerative diseases which comprise selenoprotein P or C-terminal peptide(s) of this protein
as the main active ingredient. These remedies are appropriately usable for neurodegenerative diseases showing motor ataxia as the
major symptom.

(57) 要約:

セレノプロテイン P または当該蛋白質の C 末端ペプチドもしくは当該ペプチド
群を主要有効成分とする神経変性疾患治療剤。運動失調を主たる病態とする神経
変性疾患に対する好適な神経変性疾患治療剤が提供される。

WO 02/092121 A1

明 細 書

新規な神経変性疾患治療剤

技術分野

本願発明は医療用医薬品の分野に関し、血漿蛋白質の新たな用途に関する。さらに詳細には、運動失調症等をもたらす神経変性疾患に対する医薬品に関し、血漿蛋白質の一種であるセレノプロテインPを、好適には当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主たる有効成分として含有する神経変性疾患治療剤に関する。

背景技術

神経変性疾患は、運動機能の低下(運動失調)等をもたらすことが知られている。神経変性疾患の例としてはアルツハイマー老年痴呆症、若年性アルツハイマー痴呆症、ピック病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、進行性核上麻痺、難治性てんかんなどが一般に知られている。

運動失調をきたす神経中枢性障害を部位別に分類列举すると、大脳(前頭葉)性、小脳性、前庭(迷路)性および脊髄性の運動失調症がある。大脳性運動失調症では大脳皮質、殊に前頭葉性の障害が考えられ、脳血管障害性病変、脳萎縮、外傷、腫瘍、ピック病をはじめ慢性硬膜下血腫などでしばしば問題となる。また、失調性歩行のほか精神機能の低下を示す。小脳性運動失調症は、小脳障害すなわち小脳腫瘍、血管性障害、変性性疾患、小脳萎縮、奇形などに伴う重要な症状で、小脳虫部の損傷では主として体幹性失調をきたし、起立歩行の障害・蹣跚歩行、大歩行を示し、一般に姿勢、体位保持が困難で平衡バランス障害をきたす。

それに反し、小脳半球性障害では四肢筋トーンの異常、筋緊張の低下を示し、患側方向への偏位歩行、協調運動不能、誤示(指一指、指一鼻試験)、運動測定障害、ホームズ・スチュアート現象のほか、企図振戦や小脳性言語(断続性・爆発性)を伴う。前庭(迷路)性失調症では、前庭機能障害に由来し、原因としてその多くは耳科的、内耳性障害性疾患の存在あるいは後遺症としてみられる。例えば、メニエール病、突発性難聴、ストレプトマイシンやカナマイシンなどの薬物中毒による平衡神経の障害、外傷、梅毒、音響外傷、耳硬化症、内耳炎(およびその続発症)が挙げられる。脊髄性運動失調症は、別名、後索性運動失調症と呼

称するごとく、脊髄後索障害により深部感覚の障害すなわち、位置覚、関節覚、握覚の障害により失調をきたすものである。フリードライヒ運動失調症、亜急性脊髄連合変性症、脊髄癆などで特徴的にみられる。

例えば、運動失調症を主症状とする疾患として脊髄小脳変性症（SCD）が知ら
5 れているが、これは、原因不明の神経変性疾患の総称である。臨床的には小脳性
ないしは後索性の運動失調を主症状とする。運動失調症状が徐々に出現し、緩徐
に進行する経過をとる。運動失調、体幹運動失調、協調運動障害のみ呈する場合
もあるが、それ以外の症状を呈する場合が少なくなく、他の症状として、小脳性
言語障害、例えば筋固縮や無動などのパーキンソニズムを中心とする錐体外路徴
10 候、腱反射亢進や時に病的反射を見る錐体路徴候、眼振や不随意運動（末梢神経
症状）、起立性低血圧や排尿障害を中心とする自律神経症状、頻度は少ないが病
型によっては認められる知能障害などを示すものがある。従って、SCDは運動
失調症状を呈する神経変性症疾患を代表していると位置づけることができる。

SCDにおける主要病変部位による分類では、1)小脳型（小脳皮質に病変を有
15 するHolmes型など）、2)脊髄小脳型（Menzel型オリーブ・橋・小脳萎縮症など）、
3)脊髄型（フリードライヒ運動失調症、遺伝性痙攣性失調症など）に分けられてい
る。運動失調症調査研究班による臨床統計によると、1990年の段階で本邦の
脊髄小脳変性症の頻度は10万人当たり約7～10人程度であり、そのうち約6
0%は弧発性すなわち非遺伝性症例であり、40%が遺伝性症例であるという。
20 弧発性の中でその多くはオリーブ橋小脳萎縮症であり、したがって全脊髄小脳変
性症の中でそれが最も多いことになる。一方、遺伝性症例の中では、従来は
Menzel型遺伝性運動失調症とされる病型が多かったが、最近の遺伝子診断が確実
に行われるようになり、マシャド・ジョセフ病（MJD）が最も多いことがわか
ってきた。一方、オリーブ橋小脳萎縮症など弧発性の病型の病因は全く不明であ
25 る。このように、遺伝子から病因を解明していく研究が盛んになっているが、小
脳あるいは小脳と関連した神経細胞群が選択的に死に至る理由はまだ明らかにな
っていない。

発明の開示

（発明が解決しようとする技術的課題）

脊髄小脳変性症の運動失調症状に対する唯一の薬剤が、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（Thyrotropin-releasing hormone；TRH）酒石酸塩の静脈または筋肉内投与製剤（ヒルトニン）である。作用メカニズムはほとんど解明されていないが、初期や軽症の場合、歩行失調、構音障害、運動速度などが改善する場合もあるとされている。しかしながら、その効果は1時間程度といわれ、治療効果は
5 余り高いとはいえない。また、甲状腺刺激ホルモン（TSH）の分泌促進作用もあるので、その副作用が懸念されている。最近、TSHの分泌促進作用を抑えたTRH-T誘導体経口製剤（セレジスト）が開発されたが、ローリングマウスナゴヤ（Rolling Mouse Nagoya）を用いた実験では、腹腔内投与でTRHが1時間程度、TRH改変体が3時間程度と有効時間が3倍に延長されたに過ぎず、2～3
10 週間連日投与し、2～3週間の休薬期間を取る基本的な投与パターンはあまり変わっていない。それ以外是对症療法が主体になり、例えば、手の震えなどのパーキンソニズムにはパーキンソン病治療薬、起立性低血圧などの自律神経症状には自律神経調整薬が使用されている。このような現状は、前述の運動失調症状を呈する様々な疾患でも同様で、運動失調症状を改善する有効な治療薬はほとんど知
15 られていない。従って、運動失調等を主たる病態とする神経変性疾患に対してより効果の高い新規な神経変性疾患治療剤が切望されている。

（その解決方法）

上述の状況の下、本願発明者らは先に、血液成分由来の蛋白質であるセレノプロ
20 テインPに、そしてより好適な態様として当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドに、従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められることを見出し、この知見を基に特許出願した（PCT/JP99/06322）。さらに、本願発明者らは、新たな神経変性疾患治療剤を提供すべく鋭意研究した結果、驚くべきことに従来試みられることのなかった前記セレノプロテインPまたはそのC末
25 端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、モデル動物での実際の生体内投与によって、神経変性疾患治療剤としてヒトその他の動物に十分に適用できる事実を見出し、この知見に基づいて本願発明を完成するに至った。

すなわち、本願発明は、セレノプロテインPおよび／または当該蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする神経変性疾患治療剤

に関する。

本願発明の好ましい態様において、前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群は、セレノプロテインPのC末端側260位アミノ酸から362位アミノ酸までのアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有する細胞障害抑制活性を示すペプチドまたは当該ペプチド群である。

本願発明のさらに好ましい態様において、前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群は、次式：Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys（式中、Xaaはセレノシステインを表す）（配列番号1）で表されるアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記いずれかのアミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である。

図面の簡単な説明

図1はローリングマウスナゴヤにおけるセレノプロテインPの投与1週目の転倒指数改善効果を示す図である。

図2はローリングマウスナゴヤにおけるセレノプロテインPの投与2週目の転倒指数改善効果を示す図である。

図3はローリングマウスナゴヤにおけるセレノプロテインPの投与3週目の転倒指数改善効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ (glutathione-peroxidase) とは異なるセレン含有タンパク質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン (selenocysteine) の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該蛋白質は最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された (Hill K. E. および Burk R. F., Biomed. Environ. Sci., 10, p. 198-208 (1997))。セレノプロテイン

ンPの機能はほとんど不明であったが、最近、インビトロの系でphospholipid hydroperoxideやperoxynitriteの還元活性、神経細胞のsurvival promoting factorとしての作用が見出された。

5 具体的な事例として、神経変性疾患に分類されている脊髄小脳変性症のモデルマウスであるローリングマウスナゴヤを用いたセレノプロテインPの腹腔内投与実験において、セレノプロテインP投与群に転倒指数(転倒回数/自発運動)の減少効果が認められ、運動失調症の改善作用があることが判明した。これらのことから、セレノプロテインPが運動失調症を主たる病態とする神経変性疾患に対する治療効果を有していることが示された。

10 本願発明は、セレノプロテインPの前記知見に基づく新たな薬効に関するものであり、本願発明の神経変性疾患治療剤の本態はセレノプロテインPである。さらに詳細には、セレノプロテインPの中のセレンを含むセレノシステインに特徴があり、このアミノ酸が運動失調改善作用の中心アミノ酸であると思われる。本願発明者らは、すでに、血液成分由来の蛋白質であるセレノプロテインPのC末端側ペプチド断片に從來報告されていなかった細胞死抑制活性が認められること
15 を見出し、特許出願している。この活性にも、含有されるセレノシステインが関与していることが明らかである。従って、セレノシステインを含み細胞死抑制活性を持つ蛋白質および/またはペプチド群は、神経変性疾患治療剤の候補となる。

20 そもそも、本願発明に係るセレンは、微量必須元素の一つであり、それが欠乏した場合には心筋症などを伴う重篤な欠乏症が知られている。また、無血清培養の培地に亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であることから、セレンが細胞レベルでの生存維持・増殖に必須であることが示されている。しかしながら、セレン化合物が毒物指定されていることから理解されるように、有効量と危険量の
25 幅、つまり安全域の濃度幅が狭く、適量以上のセレン化合物は一般的には細胞にとって毒性を示し、逆に細胞死を誘導する。例えば、セレンの急性中毒症状として、顔面蒼白、神経症状、神経障害、皮膚炎、胃腸障害などが知られている。また、細胞培養にセレノシステインの2量体であるセレノシスチンを添加すると、単独ではかなり強い毒性を示す。

これに対して、本願発明の好適な態様であるセレノプロテインP、セレノプロテインPのC末端側断片は、その構造中に9～10個のセレノシステインを含むにも拘わらず、強い毒性は観察されなかった。このことから、本願発明の薬効作用を示すセレノプロテインPの特徴として、セレノシステインを含み、なおかつ毒性が減弱していることが重要と思われる。実際に、セレノプロテインPアミノ酸配列由来の4～14アミノ酸のセレノシステインを含有した合成ペプチドにおいてもセレノシスチンが毒性を示す濃度において毒性を示すことはなかった。本願発明のペプチドまたは当該ペプチド群は、毒性の低減というセレン化合物に対する命題を克服するのみならず、予期し得ない運動失調改善作用をもたらすことを可能とするものである。

ここで用いられるセレノプロテインPに特段の制約はなく、所望の運動失調改善活性を有するものであれば如何なる分子形態のものをも包含する。すなわち、完全分子型セレノプロテインPをはじめ種々の分子形態のものが対象となり得る。この中で、好適な態様はセレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群であり、中でもC末端側103個(260位から362位まで)のアミノ酸配列、当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列、または前記アミノ酸配列をその一部として含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群は、とりわけ好適な態様として推奨され得る。アミノ酸置換に関しては、とりわけCysがSerに置換された態様のものが望ましい。

本願発明において最も好適なペプチドは、次式：Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (式中、Xaaはセレノシステインを表す) (配列番号1) で表されるアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記いずれかのアミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有するものである。

本明細書において「当該ペプチド群」とは、セレノプロテインPのアミノ酸配列に由来する少なくとも1個のセレノシステインを含む4～14個程度のアミノ酸配列または1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該ア

ミノ酸配列を含むペプチドであって、糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微細構造の異なるペプチドの集合体を意味する。すなわち、本願発明のセレノプロテインPおよびペプチド群は、セレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、運動失調改善活性を有するものであればその分子形態に特段の制約はなく、これらには完全分子型のセレノプロテインPをはじめこれに起因するC末端側ペプチド等が含まれる。このような本願発明のペプチドは、ペプチド合成機を用いて常法に従って調製することもできるし、また、本願発明のペプチドをリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

本願発明に使用されるセレノプロテインPまたは当該蛋白質に由来するペプチドもしくはペプチド群を製造する方法は特に限定されるものではないが、例えばヒト血液より分離する方法、または遺伝子組換え技術により製造することができる。本願発明に使用される神経変性疾患治療剤の主要構成成分となるセレノプロテインPまたは当該蛋白質に由来するペプチドもしくはペプチド群は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、これを精製同定するに際しては、一つの態様として、血漿を出発原料とし種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、抗体カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を組み合わせることにより、所望のセレノプロテインPまたはペプチドもしくはペプチド群を分画することが可能である。好ましくは、例えば当該ペプチドまたはペプチド群に対して、順に、ヘパリンクロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより精製することができる。

本願発明に使用される神経変性疾患治療剤の主要構成成分となるセレノプロテ

インPまたは当該蛋白質に由来するペプチドもしくはペプチド群はまた、当該蛋白質に対する抗体を適当な担体に結合させ、これを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製することもできる。かかるアフィニティークロマトグラフィーと上記陽イオン交換クロマトグラフィーとを用いた望ましい態様の例を調製例1に示す。

本願発明では、有効成分としての当該蛋白質またはペプチドもしくはペプチド群と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の神経変性疾患治療剤とすることができる。本願発明の神経変性疾患治療剤の有効投与量は、投与対象者の年齢、症状および重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動する。薬効は投与方法には依存しないが、皮下、皮内、腹腔への投与、血管内への単回（ボラス）投与あるいは点滴投与などが最適である。また、分子量の小さなペプチド群の場合は、経口投与や経皮投与なども可能である。

本願発明の神経変性疾患治療剤の投与対象は、神経変性疾患全般に対して適用可能であるが、とりわけ運動失調（運動機能機能の低下）を主たる病態とする神経変性疾患に対して特に有効である。神経変性疾患治療剤として本願発明のセレノプロテインPまたはこれに由来するペプチドもしくはペプチド群を主要構成成分として含有する薬剤を使用する場合、本薬剤を単独で投与することもできるし、他の治療薬剤との併用投与も効果を増大させるための有効な手段として期待できる。

以下、調製例および実施例に沿って本願発明をさらに詳細に説明するが、これらは本願発明の範囲を何ら限定するものではない。なお、以下に示す調製例および実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社製の試薬を使用した。

調製例 1

（セレノプロテインPに対する抗体結合担体（抗SeP抗体カラム）を用いたセレノプロテインP断片の精製）

以下に記載するように、セレノプロテインPの有する細胞死抑制活性を指標にセレノプロテインPおよびセレノプロテインP断片を血漿から精製した。

血漿中のヘパリンセファロース結合画分を2M硫酸アンモニウムにより沈殿さ

せ、その沈殿画分に対して5倍以上の20mM Tris (pH8.0)により沈殿を溶解させた。この溶液に存在するセレノプロテインPを、セレノプロテインP断片に対する抗体結合担体 (抗SeP抗体カラム) に結合させ、PBSで洗浄した。その後、4M尿素を含有する20mMクエン酸バッファーによりセレノプロテインPを溶出し、20mMクエン酸バッファーで平衡化した陽イオン交換体 (Macroprep High S: BioRad) に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行い、細胞死抑制活性を示す画分を回収した。この時、全長のセレノプロテインPも同時に得ることが可能であるが、蛋白あたりの細胞死抑制活性は明らかに弱い値を示した。本方法では、短時間の精製が可能であるため、蛋白あたりの細胞死抑制活性の強いセレノプロテインP断片を得ることができた。ここで得られた断片は、糖鎖の有無、分子間結合の有無、内部切断の有無などにより種々のサイズの分子種を含む混合画分であり、非還元電気泳動で10～30kDaのサイズを示すセレノプロテインP断片群であった。

調製例2

(ペプチド合成)

セレノシステインは、Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl)、MBzl (p-Methoxybenzyl) で保護したアミノ酸を合成し、ペプチド合成機を用いたFmoc法により所望のペプチドを合成した。その後、脱保護を行ない、逆相HPLCにより精製した。

本願発明者らは、細胞障害抑制活性を示すセレノプロテインP断片のアミノ酸配列: 260Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn362 (式中、Xaaはセレノシステインを表す) (配列番号2) から還元状態で精製されたペプチド Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番

号3)も細胞障害抑制活性を有することを確認した。そこで、この知見を基に以下の配列を有するペプチド断片を合成した。

表1

ペプチド1:

5 Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala
Pro Arg Ser (配列番号4)

ペプチド2:

Arg Ser Ser Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号5)

ペプチド3:

10 Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号1)

ペプチド4:

Arg Ser Xaa Ser Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号6)

ペプチド5:

Arg Ser Xaa Ser Ser His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号7)

15 ペプチド6:

Arg Ser Xaa Ser Ser His Ser Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号8)

ペプチド7:

Arg Ser Xaa Ser (配列番号9)

ペプチド8:

20 Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Ser Lys (配列番号10)

ペプチド9:

Glu Asn Leu Pro Ser Leu Ser Ser Xaa Gln Gly Leu Arg (配列番号11)

ペプチド10:

Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Ser Gln Xaa Arg (配列番号12)

25 ペプチド11:

Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg (配列番号13)

ペプチド12:

Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu (配列番号14)

ペプチド13:

Xaa Pro Ser Asn (配列番号 15)

ペプチド 14 :

Lys Glu Phe Ile Leu His Arg Ser His Ser Ser Xaa Ser Arg (配列番号 16)

ペプチド 15 :

5 Ser Xaa Ser

ペプチド 16 :

Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln (配列番号 17)

(ペプチド 14 のアミノ酸配列はペプチド 6 の C 末端から N 末端方向へのアミノ酸配列に対応する)

10 参考例

(細胞障害抑制活性)

細胞障害抑制活性のアッセイ系に使用する D a m i 細胞 (Greenberg S. M. ら、Blood vol. 72, p. 1968-1977 (1988) に記載) を用いて、アッセイ培地 (50% P B S / S A / 0.03% H S A (S I G M A 社製)) または S A / 0.05% 脱脂肪酸 B S A (W A K O 社) / 4 μ M の長鎖多価脂肪酸 (アラキドン酸、リノール酸またはリノレン酸等) により 2 回洗浄して 3×10^4 細胞 / m l になるように懸濁後、
15 得られた細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ 200 μ l、段階希釈のためのウェルには 100 μ l ずつを 96 ウエルプレートに分注した。サンプル添加ウェルにアッセイ試料として調製例 2 で合成したペプチド、およびセレノシスチン、セ
20 レノメチオニン、エプセレン、亜セレン酸ナトリウムについて同一濃度の溶液を調製し、それらを 2 μ l 添加し攪拌後、100 μ l 細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。そして、37℃の CO₂ インキュベーターで 4~5 日間培養し細胞の生死を判定した。

調製例 2 で得られた前記ペプチドについて、細胞障害抑制活性を測定したところ、
25 セレノシステイン含有ペプチド (ペプチド 3~ペプチド 16) は基本的に細胞障害抑制活性を有することが確認できた。この中でも C y s を S e r に全て置換したペプチド 6 が最も低濃度で効果的に細胞障害を抑制した。また、他のセレン含有物質の毒性が認められる濃度でも、ペプチド結合を有するセレノシステインの毒性は認められなかった。表 2 参照。

表2

	ペプチド名	アミノ酸配列	活性/1mM Sec
	ペプチド1:	KRCINQLLCKLPTDSELAPRS (配列番号4)	0
5	ペプチド2:	RSSCCHCRHLIFEK (配列番号5)	0
	ペプチド3:	RSUCCHCRHLIFEK (配列番号1)	95,000
	ペプチド4:	RSUSCHCRHLIFEK (配列番号6)	24,000
	ペプチド5:	RSUSSHCRHLIFEK (配列番号7)	16,000
	ペプチド6:	RSUSSHSRHLIFEK (配列番号8)	395,000
10	ペプチド7:	RSUS (配列番号9)	95,000
	ペプチド8:	TGSAITUQSK (配列番号10)	79,000
	ペプチド9:	ENLPSLSSUQGLR (配列番号11)	24,000
	ペプチド10:	AEENITESSQUR (配列番号12)	6,000
	ペプチド11:	LIPTEASASUR (配列番号13)	28,000
15	ペプチド12:	KNQAKKUE (配列番号14)	24,000
	ペプチド13:	UPSN (配列番号15)	24,000
	ペプチド14:	KEFILHRSHSSUSR (配列番号16)	95,000
	ペプチド15:	SUS	95,000
	ペプチド16:	LPPAAUQISQQ (配列番号17)	24,000
20	精製セレノプロテインP断片		470,000
	(上記アミノ酸配列中、Uはセレノシステインを表す)		

実施例1

(セレノプロテインPのローリングマウスナゴヤの運動失調に対する作用)

- 25 セレノプロテインPの運動失調改善作用を確認するために、運動失調モデルとして確立されているローリングマウスナゴヤの転倒指数を指標とし検討した。群構成として、対照(生理食塩水)腹腔内(0.25mL/head/週)投与群、セレノプロテインP(低用量)腹腔内(0.05mg/head/週、0.25mL/head/週)投与群、セレノプロテインP(高用量)腹腔内(0.5mg/head/週、0.25mL/head/週)投与群の各10匹ずつを設定し、週1回、3週間にわたって投与した。

試験動物は、ローリングマウスナゴヤ(113匹、5~8月齢、体重:19.1~36.2g)を雌雄の区別なく使用した。群分けは、測定開始日前日の体重および測定開始前に事前に測定した転倒指数を指標として行った。自発運動量は、投与直前(投与前30~0分)、投与直後(投与後0~30分)、投与後1時間(投与後60~90分)、投与後3時間(投与後180~210分)、投与後7時間(投与後420~450分)にそれぞれ30分間毎に自発運動測定装置にて測定した。転倒回数は、自発運動量を測定した時間帯と同一時間帯において、自発運動測定装置の上に取り付けたビデオカメラにて撮影し、カウントした。転倒指数は、転倒回数(回/30分)÷自発運動(回/30分)にて算出した。その結果を図1~図3に示す(# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$:投与前値との比較で有意(paired t-test)、* $p < 0.05$:同一時間帯の対照との比較で有意(Turkey test))。

セレノプロテインPの高用量投与(0.5mg/head)により、投与1週目、2週目および3週目の各時間帯の転倒指数は対照群と比較して低値で推移し、投与1週目の投与後60~90分に有意な低下が認められた。さらに、投与前値との比較では、投与1週目の投与後420~450分に、投与2週目の投与後60~90分、投与後180~210分および投与後420~450分に、投与3週目の投与後60~90分において、有意に転倒指数の低下が認められた。一方、セレノプロテインPの低用量投与群(0.05mg/head)においては、明らかな転倒指数の低下は認められなかった。

本願発明により、運動失調を主たる病態とする神経変性疾患に対する好適な神経変性疾患治療剤が提供される。

請求の範囲

1. セレノプロテインPおよび／または当該蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする神経変性疾患治療剤。
2. 前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、セレノプロテインPのC末端側260位アミノ酸から362位アミノ酸までのアミノ酸配列、1
5 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有する細胞障害抑制活性を示すペプチドまたは当該ペプチド群である、請求項1記載の神経変性疾患治療剤。
- 10 3. 前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、次式：Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys(式中、Xaaはセレノシステインを表す)(配列番号1)で表されるアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記いずれかのアミノ酸配列をその一部に含有するアミノ
15 酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である請求項1または請求項2記載の神経変性疾患治療剤。
4. 神経変性に起因する主たる病態が運動失調である、請求項1から請求項3のいずれかに記載の神経変性疾患治療剤。

1/3

図 1

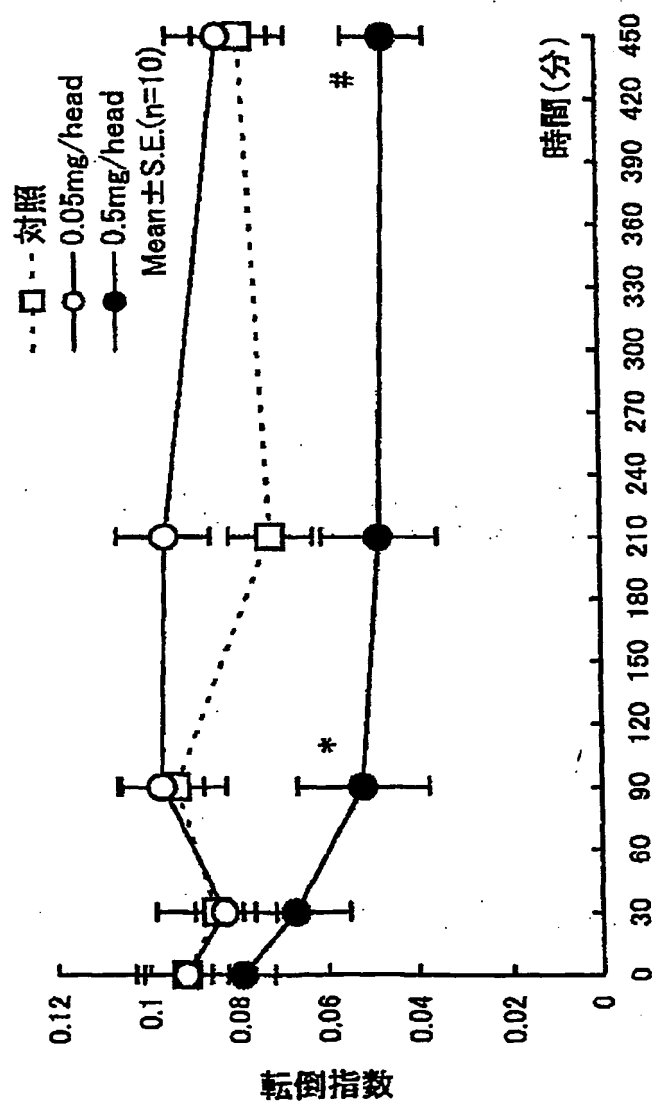
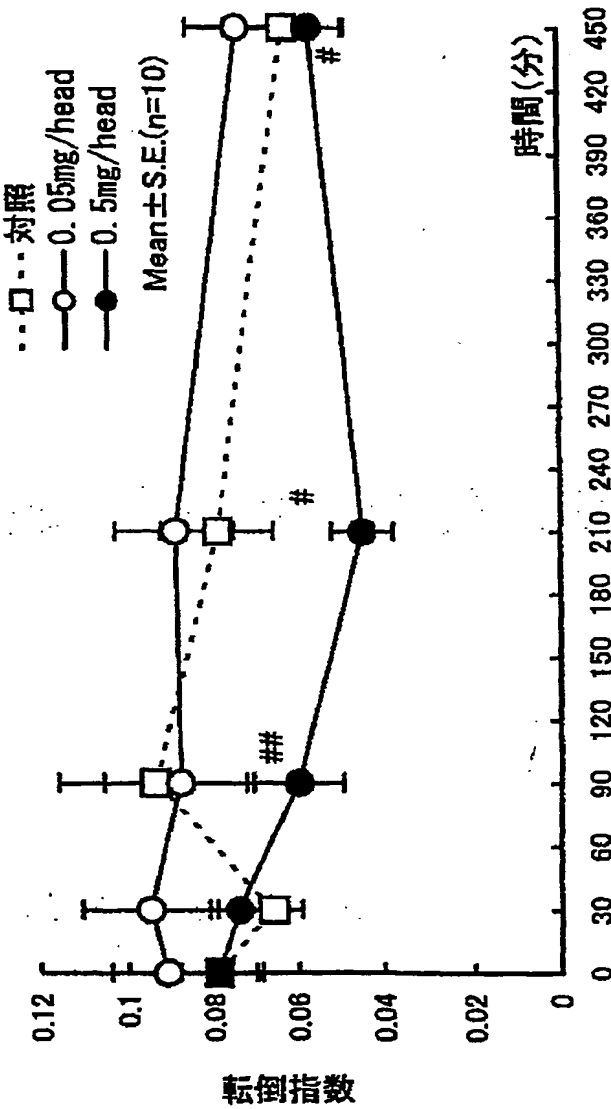
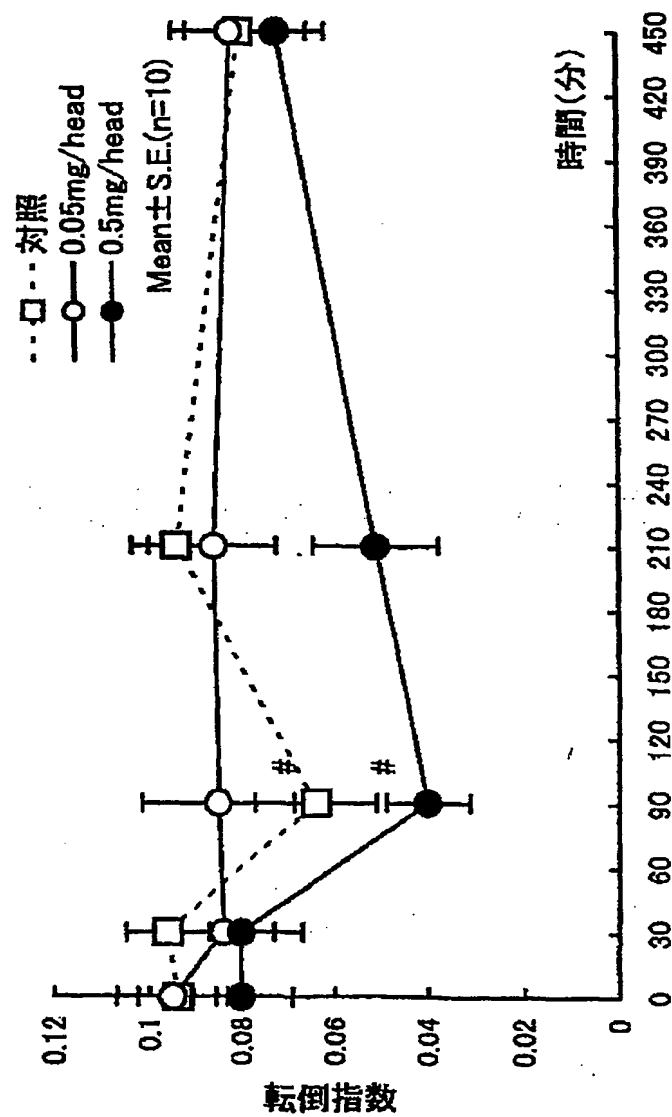


図 2



3/3

図 3



1/9

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
HISAMITSU SEIYAKU K.K.

<120> NOVEL MEDICAMENT FOR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES

<130> 663196

<150> JP 2001-141462

<151> 2001-05-11

<160> 15

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 1

Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys

1

5

10

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

2/9

<213> Human plasma

<220>

<223> Fragment of selenoprotein P

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 2

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

260 264 269 274

Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu

279 284 289

Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser

294 299 304

Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser

309 314 319

Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu

324 329 334 339

Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln Ala Lys

344 349 354

Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn

359

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

3/9

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 3

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1

5

10

15

Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu

20

25

30

Lys

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Human plasma

<400> 4

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1

5

10

15

Leu Ala Pro Arg Ser

20

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Human plasma

<400> 5

Arg Ser Ser Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys

4/9

1

5

10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 6

Arg Ser Xaa Ser Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys

1

5

10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 7

Arg Ser Xaa Ser Ser His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys

1

5

10

5/9

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 8

Arg Ser Xaa Ser Ser His Ser Arg His Leu Ile Phe Glu Lys

1

5

10

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 9

Arg Ser Xaa Ser

1

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

6/9

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 10

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Ser Lys

1

5

10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 11

Glu Asn Leu Pro Ser Leu Ser Ser Xaa Gln Gly Leu Arg

1

5

10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

7/9

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 12 .

Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Ser Gln Xaa Arg

1

5

10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 13

Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 14

8/9

Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu

1

5

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 15

Xaa Pro Ser Asn

1

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 16

Lys Glu Phe Ile Leu His Arg Ser His Ser Ser Xaa Ser Arg

1

5

10

15

9/9

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 17

Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, 38/00, A61P25/00, 25/16, 25/28, 25/14, 25/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/31131 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 02 June, 2000 (02.06.00), Claims; page 12, line 24 to page 13, line 7; example 10; particularly, page 29, lines 3 to 8 & AU 0011795 A & EP 1132402 A1	1-4
P,X	JP 2002-060346 A (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 26 February, 2002 (26.02.02), (Family: none)	1-4
X	Xiaoguang YANG et al., Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes, Biochimica et Biophysica Acta, 2000, Vol.1474, pages 390 to 396; abstract; discussion	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 August, 2002 (06.08.02)

Date of mailing of the international search report

20 August, 2002 (20.08.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04558

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Jun YAN et al., Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P, The Journal of Neuroscience, 1998, Vol.18, No.21, pages 8682 to 8691; abstract; discussion; particularly, page 8690	1-4
X	Volker MOSTERT, Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, Vol.376, No.2, pages 433 to 438; abstract; page 436, right column, lines 7 to 13	1-4
X	Motoko FUJII et al., Regulation of selenoprotein P mRNA expression in comparison with metallothionein and osteonectin mRNAs following cadmium and dexamethasone administration. Kobe Journal of Medical Sciences, 1997, Vol.43, No.1, pages 13 to 23 Synopsis, Discussion; particularly, page 20, line 2 from the bottom to page 21, line 6	1-4
X	T. BERRY, A selenium transport protein model of a sub-type of schizophrenia. Medical Hypotheses, 1994, Vol.43, pages 409 to 414; abstract; introduction; conclusion	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 38/00, A61P25/00, 25/16, 25/28, 25/14, 25/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17, 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/31131 A1 (財団法人 化学及血清療法研究所) 2000.06.02, 請求の範囲, 第12頁目第24~第13頁目第7行目, 実施例10 特に第29頁目第3~8行目 & AU 0011795 A & EP 1132402 A1	1-4
P, X	JP 2002-060346 A (財団法人化学及血清療法研究所) 2002.02.26 (ファミリーなし)	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.08.02

国際調査報告の発送日

20.08.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

4 P

3 1 2 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Xiaoguang YANG他, Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 2000 Vol.1474, pages390-396 Abstract, Discussion	1-4
X	Jun YAN他, Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P, THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 1998 Vol.18, No.21, pages8682-8691 要約, Discussion 特に第8690頁目	1-4
X	Volker MOSTERT, Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, Vol.376, No.2, pages 433-438, 要約, 第436頁目右欄第7～13行目	1-4
X	Motoko FUJII他, Regulation of selenoprotein P mRNA expression in comparison with metallothionein and osteonectin mRNAs following cadmium and dexamethasone administration. KOBE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES, 1997, Vol.43, No.1, pages 13-23, SYNOPSIS, DISCUSSION 特に第20頁目下から2行目～第21頁目第6行目	1-4
X	T. BERRY A selenium transport protein model of a sub-type of schizophrenia. MEDICAL HYPOTHESES, 1994, Vol.43, pages 409-414, Abstract, Introduction, Conclusion	1-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)